

С. В. Пастон¹, А. И. Николаев²

ВЛИЯНИЕ ЭДТА НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ДНК С ИОНАМИ Cu^{2+} *

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,

Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

² Университет Страсбурга, Франция, 67081, Страсбург, ул. Б. Паскаля, 4

В работе изучается взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК в растворе в присутствии ЭДТА методом кругового дихроизма. Установлено, что комплекс азотистых оснований ДНК с ионами меди разрушается при введении ЭДТА в раствор. Исследование растворов, содержащих тимидин (Thy), CuCl_2 и ЭДТА, методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем показало наличие сложных комплексов $[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot \text{Na}^+ \cdot 2\text{H}^+ \cdot \text{Thy}$, $2\{[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot \text{Na}^+ \cdot 2\text{H}^+ \cdot \text{Thy}\}$ и $2\{[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot 3\text{Na}^+ \cdot \text{Thy}\}$, где $[\text{Y}^{4-}]$ — полностью депротонированная форма ЭДТА. Во всех наблюдаемых комплексах стехиометрическое отношение $\text{Thy} : [\text{Y}^{4-}] : \text{Cu}^{2+} = 1 : 1 : 1$. Появление сложных комплексов азотистых оснований с Cu^{2+} и ЭДТА можно ожидать на участках ДНК с дестабилизированной вторичной структурой, которые могут возникать в результате тепловых движений интактной ДНК, и в ДНК, связанной с лигандами или имеющей дефекты первичной структуры. В растворах ДНК, содержащих Cu^{2+} либо Cu^{2+} и ЭДТА, наблюдается усиление дестабилизации вторичной структуры макромолекулы под действием УФ-С света. Библиогр. 44 назв. Ил. 5. Табл. 1.

Ключевые слова: ДНК, ЭДТА, ионы меди, круговой дихроизм, масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем.

S. V. Paston¹, A. I. Nikolaev²

EDTA INFLUENCE ON THE DNA COMPLEXATION WITH Cu^{2+}

¹ St. Petersburg State University,

7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

² University of Strasbourg, 4, rue B. Pascal, Strasbourg, 67081, France

Interaction of copper ions with DNA in solution in the presence of EDTA is studied with the method of circular dichroism. The results show that the complex of DNA nucleobases with copper ions is destroyed at the EDTA addition to the solution. Investigation of the solutions of thymidine (Thy), CuCl_2 and EDTA by the method of electrospray ionization mass spectrometry reveals the existence of compound complexes $[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot \text{Na}^+ \cdot 2\text{H}^+ \cdot \text{Thy}$, $2\{[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot \text{Na}^+ \cdot 2\text{H}^+ \cdot \text{Thy}\}$ and $2\{[\text{Y}^{4-}] \cdot \text{Cu}^{2+} \cdot 3\text{Na}^+ \cdot \text{Thy}\}$, where $[\text{Y}^{4-}]$ is completely deprotonated form of EDTA. In all complexes observed the $\text{Thy} : [\text{Y}^{4-}] : \text{Cu}^{2+}$ binding stoichiometry is 1 : 1 : 1. One can expect the appearance of nucleobases complexes with Cu^{2+} and EDTA in DNA sites with destabilised secondary structure as a result of heat motion of intact DNA, or in ligand binding locus, and also in the sites with primary structure defects. In the DNA solutions with Cu^{2+} or with Cu^{2+} and EDTA the increase in DNA secondary structure disturbance under the action of UVC light is observed. Refs 44. Figs 5. Tables 1.

Keywords: DNA, EDTA, copper ions, circular dichroism, electrospray ionization mass spectrometry.

Введение. Медь в организме играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях, метаболизме фенольных соединений, развитии внеклеточного матрикса

* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-08-06876).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

са [1, 2]. Как недостаток, так и избыток меди приводит к серьёзным заболеваниям. Токсичность больших концентраций меди связана, в частности, с её способностями провоцировать окислительный стресс, вытеснять другие ионы металлов с их мест связывания в биологических молекулах, а также связываться с ДНК [2–4]. Ионы меди образуют комплексы с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, а также с азотистыми основаниями [5, 6]. По степени сродства к азотистым основаниям ДНК и по величине дестабилизирующего действия на её вторичную структуру Cu^{2+} занимает первое место среди двухвалентных катионов, присутствующих в организме [7, 8]. Свойство иона Cu^{2+} образовывать координационную связь с азотистыми основаниями ДНК используют при конструировании противоопухолевых препаратов. Есть надежда, что такие противоопухолевые препараты благодаря тому, что многие опухолевые ткани по сравнению с нормальными накапливают избыточное количество меди, будут обладать селективностью к раковым клеткам [9–11].

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) — четырёхосновная кислота, важнейший представитель комплексонов, образующих прочные соединения — хелаты с ионами металлов. Одна молекула ЭДТА координирует один ион металла двумя атомами азота и тремя или четырьмя карбоксильными группами [12]. Благодаря способности образовывать прочные полидентантные комплексы с ионами металлов ЭДТА широко применяется в аналитической химии, в медицине в качестве антидота при отравлениях тяжёлыми металлами, для растворения и предотвращения образования различных отложений, для очистки сточных вод, в сельском хозяйстве и пищевой промышленности и других отраслях [12–14]. Комплексы ЭДТА с Cu^{2+} используют при синтезе полиоксометаллатов — гибридных материалов с интересными каталитическими, оптическими и магнитными свойствами [15].

Изучение взаимодействия ЭДТА и её комплексов с ДНК представляет интерес, так как ЭДТА входит в состав буферных растворов для гель-электрофореза и для хранения образцов нуклеиновых кислот [16, 17]. С помощью ИК-спектроскопии в плёнках наблюдались признаки комплексообразования ЭДТА с фосфатными группами и азотистыми основаниями ДНК без нарушения вторичной структуры макромолекулы [17]. Авторы полагают, что OH- и C=O- группы ЭДТА замещают молекулы воды в гидратной оболочке ДНК. В последнее время комплексы ЭДТА с двухвалентными катионами рассматриваются как искусственные ДНК-нуклеазы [18, 19].

В серии работ [20–22] изучались растворы и плёнки, содержащие ДНК, Cu^{2+} , а также ряд люминесцирующих лигандов на основе фенантролина, содержащих ион Ru^{2+} . Бороздочное связывание и частичная интеркаляция лигандов такого типа в двойную спираль ДНК приводит к сильному росту интенсивности люминесценции. Введение ионов Cu^{2+} в систему, содержащую сформировавшийся комплекс лиганд–ДНК, приводит к тушению люминесценции лиганда, а последующее добавление в раствор ЭДТА — к её восстановлению. Тушение люминесценции, по мнению авторов [20–22], возникает вследствие образования комплекса лиганд–ДНК– Cu^{2+} . Предполагается, что при добавлении ЭДТА к существующему комплексу лиганд–ДНК– Cu^{2+} все катионы меди в системе переходят в хелатные комплексы ЭДТА– Cu^{2+} , что приводит вновь к возникновению комплекса лиганд–ДНК и, как следствие, к восстановлению люминесценции лиганда. Следует, однако, отметить, что это допущение сделано в отсутствие прямых данных о структуре ДНК в рассматриваемых комплексах.

В представляемой работе изучается взаимодействие катионов Cu^{2+} с ДНК в присутствии ЭДТА. Для этой цели использовали метод кругового дихроизма (КД), весьма чувствительный к изменению электронной структуры хромофоров и широко

применяемый для изучения взаимодействия азотистых оснований ДНК с катионами [6, 23, 24] и другими низкомолекулярными лигандами [25, 26]. Для выявления возможных комплексов ДНК—Cu²⁺—ЭДТА проведено исследование растворов, содержащих тимидин, CuCl₂ и ЭДТА, методом масс-спектрометрии (ионизация электроспреем).

В исследованиях использовали динатриевую соль ЭДТА (Na₂H₂Y · 2H₂O) (рис. 1). Появление сложных комплексов азотистых оснований с Cu²⁺ и ЭДТА можно ожидать на участках ДНК с дестабилизированной вторичной структурой, которые могут возникнуть в результате тепловых движений интактной ДНК, и в ДНК, связанной с лигандами или имеющей дефекты первичной структуры [27].

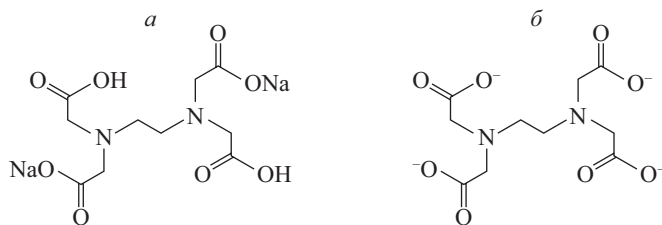


Рис. 1. Динатриевая соль ЭДТА (Na₂H₂Y) (а); полностью депротонированная форма ЭДТА (Y⁴⁻) (б) [13]

Устойчивость комплексов ЭДТА с ионами металлов тем выше, чем больше заряд и меньше радиус катиона. Константа устойчивости комплекса металла Me и ЭДТА определяется, согласно [12]:

$$K_1 = \frac{[\text{Me—ЭДТА}]}{[\text{Me}][\text{ЭДТА}]}.$$

Все катионы, кроме щелочных, образуют с ЭДТА комплексы, обладающие достаточно высокими константами устойчивости, чтобы их можно было определять методом комплексонометрического титрования. Для используемых в работе катионов, $\lg K_1(\text{Na}^+) = 1,7$, $\lg K_1(\text{Cu}^{2+}) = 18,8$ [12].

Материалы и методы. Использовали тимидин (Sigma, США) и ДНК из тимуса телёнка (Sigma, США) молекулярной массы $M = (10,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$ Да. Молекулярная масса ДНК определена по значению характеристической вязкости $[\eta]$ в растворе 0,15M NaCl [28]. Концентрацию ДНК в растворе (C) определяли по методу Спирина [29]. Нативность ДНК контролировали по величине молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{260}(P)$. Поглощение растворов ДНК в УФ-диапазоне измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия) в прямоугольной кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 1$ см. Спектры КД регистрировали с шагом 0,1 нм на дихрографе Mark IV (Jobin Yvon, Франция) в цилиндрической кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 1$ см и усредняли по трём последовательным измерениям. Использовали динатриевую соль ЭДТА в виде стандарт-титра Na₂C₁₀H₁₄N₂O₈ · 2H₂O для приготовления 1 л 0,05M раствора. Раствор был приготовлен в соответствии с [30]. Концентрация поддерживающего электролита в растворах ДНК 0,005M NaCl. Использовали соли NaCl и CuCl₂ марки х.ч. Растворы готовили простым сливанием исходных растворов компонентов, перед измерением выдерживали в течение 2 ч при температуре +4°C.

Масс-спектры водных растворов регистрировали на масс-спектрометре Bruker maXis HRMS-ESI-QTOF (High-Resolution Mass-Spectrometer / ElectroSpray Ionization / Quadrupole-Time-of-Flight). Фиксировали спектры положительных ионов. Обработку

масс-спектров проводили в программном пакете Bruker Compass DataAnalysis 4.0, поставляемом производителем оборудования.

Результаты и обсуждение. Взаимодействие азотистых оснований ДНК с биологически активными соединениями *in vitro*, как правило, вызывает изменения спектров КД ДНК [6, 23–26]. Предварительные исследования показали, что добавление к раствору ДНК ЭДТА вплоть до концентраций 10^{-3} М не приводит к заметным изменениям спектральных параметров ДНК [31]. В растворе ДНК с CuCl_2 с ростом $C(\text{Cu}^{2+})$ снижается интенсивность положительного максимума и усиливается батохромный сдвиг точки $\Delta\epsilon = 0$ в спектре КД ДНК [6, 32]. После добавления к раствору ДНК сформированного комплекса Cu^{2+} –ЭДТА спектр КД полученной системы практически не отличается от спектра интактной ДНК (рис. 2). Следует, однако, иметь в виду, что в отсутствие буфера комплексообразование ЭДТА с Cu^{2+} сопровождается увеличением кислотности раствора. Действительно, при нейтральных рН ЭДТА присутствует в растворе в двух формах: HY^{3-} и H_2Y^{2-} [13]. При связывании молекулы ЭДТА с двухвалентным катионом 1 или 2 протона диссоциируют в раствор:

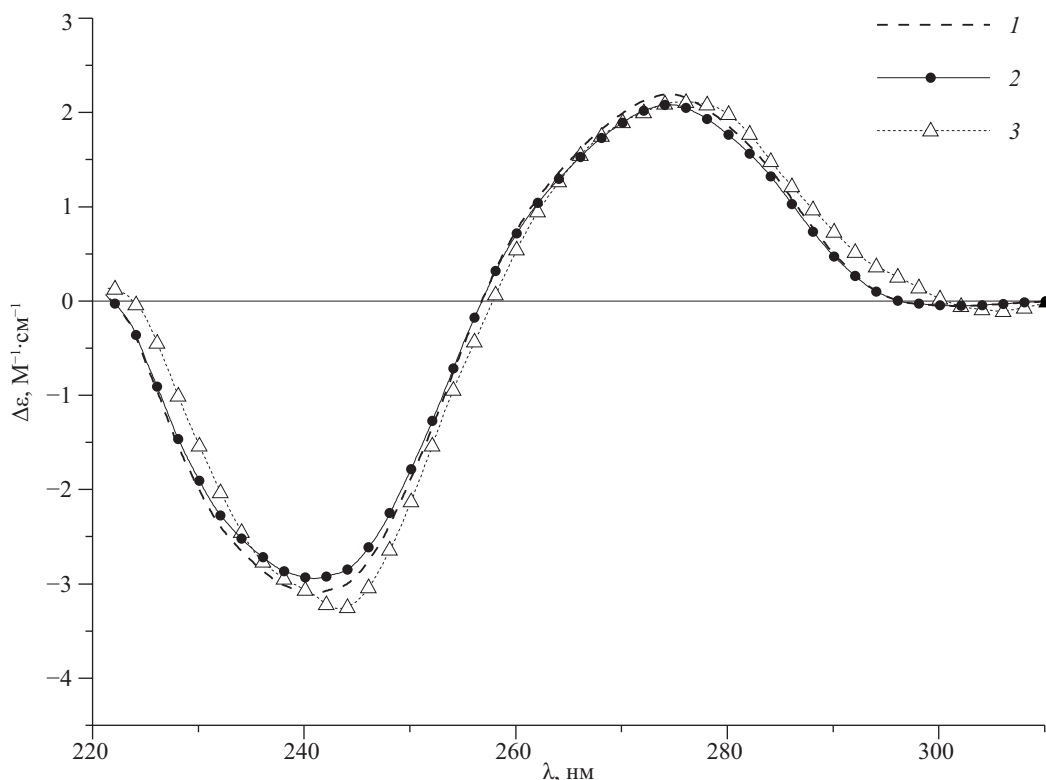
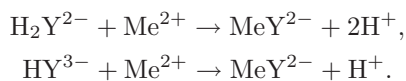


Рис. 2. Спектры КД ДНК в многокомпонентных системах:

1 — в водно-солевом растворе (контроль), 2 — при $C(\text{ЭДТА}) = 5 \cdot 10^{-5}$ М, 3 — после добавления к раствору нативной ДНК сформированного комплекса ЭДТА– Cu^{2+} ; $C(\text{ЭДТА–Cu}^{2+}) = 5 \cdot 10^{-5}$ М, рН = 6,7; во всех растворах $C(\text{ДНК}) = 0,004$ г/дл = $1,2 \cdot 10^{-4}$ М_{а.о.}

Понижение pH в растворе ДНК привело бы к протонированию макромолекулы [33]. При использованной в данной работе ионной силе 0,005M NaCl эффект протонирования начинает сказываться на спектральных свойствах ДНК при $\text{pH} \leq 5,2$ и вызывает нарушение вторичной структуры при $\text{pH} \leq 3,9$ [34]. Чтобы избежать этого, перед сливанием раствора ДНК и комплекса Cu^{2+} —ЭДТА мы добавляли к последнему по капле раствор NaOH до восстановления нейтрального значения pH.

Для обнаружения предполагаемой в [20–22] диссоциации комплекса ДНК— Cu^{2+} при введении ЭДТА в раствор был проведён следующий эксперимент. К сформировавшемуся комплексу ДНК— Cu^{2+} (рис. 3, спектр 3) был добавлен раствор ЭДТА так, чтобы в конечном растворе $[\text{ЭДТА}]/[\text{Cu}^{2+}] = 1,2$. Предварительно к раствору ЭДТА был добавлен раствор NaOH в количестве, необходимом, чтобы скомпенсировать снижение pH при образовании комплекса Cu^{2+} —ЭДТА. После добавления NaOH раствор ЭДТА остался нейтральным, очевидно, за счёт дополнительного депротонирования ЭДТА. Спектр КД системы, полученной от сливания растворов ДНК— Cu^{2+} и ЭДТА—NaOH, после установления равновесия практически совпал со спектром интактной ДНК (рис. 3, спектр 4). Это может свидетельствовать о том, что азотистые основания ДНК уже не участвуют в комплексообразовании с ионами меди, т. е. добав-

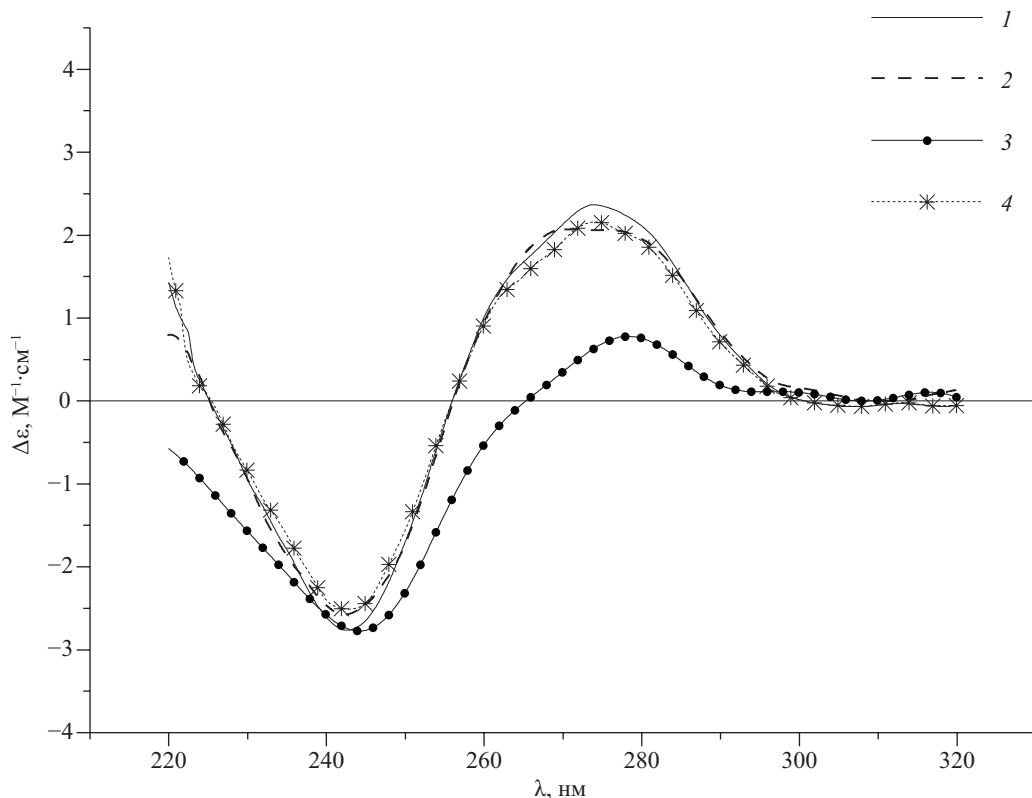


Рис. 3. Спектры КД ДНК в многокомпонентных системах:

1 — в водно-солевом растворе (контроль), 2 — при $C(\text{ЭДТА}) = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$, 3 — в растворе, содержащем CuCl_2 , $C(\text{Cu}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{M}$, 4 — после добавления к комплексу (ДНК— Cu^{2+}) нейтрального раствора ЭДТА с NaOH; конечные концентрации $C(\text{ЭДТА}) = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $C(\text{Cu}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{M}$, pH = 6,7; во всех растворах $C(\text{ДНК}) = 0,004 \text{ г/дл} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}_{\text{а.о.}}$

ление ЭДТА при сохранении нейтрального pH раствора привело к диссоциации комплекса ДНК—Cu²⁺. Такой вывод согласуется с результатами, полученными в [20–22]. Отметим, что в этих работах были использованы буферные растворы ДНК, которые компенсировали снижение pH из-за комплексообразования ЭДТА с Cu²⁺.

Для выявления возможности образования комплексов азотистых оснований с Cu²⁺ и ЭДТА на участках макромолекулы с нарушенной вторичной структурой, которые могут образовываться в ДНК в физиологических условиях, в частности, при взаимодействии с белками и низкомолекулярными лигандами [27], мы предприняли изучение растворов нуклеозида тимидина (Thy) в присутствии ионов меди и ЭДТА методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Связывание различных нуклеотидов и нуклеозидов с комплексом [Fe³⁺—ЭДТА] было обнаружено в работе [35], причём некоторые тройные комплексы образуются с участием иона H⁺. Для приготовления растворов Thy с Cu²⁺ и ЭДТА не было необходимости поддерживать нейтральное значение pH, и NaOH в этом случае не добавляли. При ионизации методом электроспрея фрагментация молекул практически отсутствует [28]. Этот способ ионизации широко используется в масс-спектрометрии для исследования комплексообразования ДНК и нуклеозидов с биологически активными соединениями и ионами, в частности, для определения стехиометрии комплексов [36–39].

На рис. 4 приведён масс-спектр тимидина в присутствии ЭДТА. На нём можно увидеть линии, присутствующие в спектре чистого тимидина (265,0796 соответствует иону Thy · Na⁺ и 507,1693 — иону 2Thy · Na⁺), а также линии, присутствующие в спектре чистой ЭДТА (315,0792 — [Y⁴⁻] · Na⁺ · 4H⁺, 337,0570 — [Y⁴⁻] · 2Na⁺ · 3H⁺ и 359,0432 — [Y⁴⁻] · 3Na⁺ · 2H⁺). По сравнению с масс-спектрами отдельных компонентов удалось интерпретировать две новые линии в масс-спектре смеси тимидина с ЭДТА (отмечены стрелками на рис. 4). Они соответствуют ионам с зарядом Z = +2, представляющим собой сложные комплексы с участием нескольких молекул тимидина и ЭДТА: 3Thy · [Y⁴⁻] · 2H⁺ · 4Na⁺ (стехиометрическое отношение Thy : [Y⁴⁻] = 3 : 1) и димер 2{Thy · [Y⁴⁻] · 3Na⁺ · 2H⁺} (Thy : [Y⁴⁻] = 1 : 1).

Масс-спектр раствора тимидина с CuCl₂, к которому добавили ЭДТА, показан на рис. 5. На нём можно заметить линии, ранее наблюдавшиеся в спектре тимидина и линии, наблюдавшиеся в растворе ЭДТА с CuCl₂ (375,9930 — [Y⁴⁻] · Cu²⁺ · Na⁺ · 2H⁺, 397,9749 — [Y⁴⁻] · Cu²⁺ · Na⁺ · 2H⁺ и 419,9571 — [Y⁴⁻] · Cu²⁺ · 3Na⁺), которые соответствуют различным комплексам ЭДТА с Cu²⁺. Интересно отметить отсутствие линий, наблюдавшихся в растворе чистой ЭДТА. По сравнению с уже рассмотренными спектрами более простых систем удалось расшифровать три новые линии (отмечены стрелками). Эти линии соответствуют сложным комплексам тимидина, ЭДТА и Cu²⁺ разного состава: однозарядный ион [Y⁴⁻] · Cu²⁺ · Na⁺ · 2H⁺ · Thy и два двухзарядных иона — димеры 2{[Y⁴⁻] · Cu²⁺ · Na⁺ · 2H⁺ · Thy} и 2{[Y⁴⁻] · Cu²⁺ · 3Na⁺ · Thy}. Во всех наблюдаемых комплексах выполняется стехиометрическое отношение Thy : [Y⁴⁻] : Cu²⁺ = 1 : 1 : 1.

Таким образом, масс-спектрометрические исследования показывают наличие комплексов тимидина с ЭДТА в отсутствие Cu²⁺ в растворе, а также тройных комплексов тимидин—ЭДТА—Cu²⁺. Можно предположить, что такие комплексы могут образовываться на одноцепочечных участках ДНК.

Тимидин — наиболее фоточувствительный из всех нуклеозидов в составе ДНК. Основной тип повреждений в структуре ДНК, вызванных УФ-светом вблизи максимума в её спектре поглощения (260 нм), — образование димеров тимина, а также других тиминовых аддуктов [40]. Мы исследовали влияние ионов меди и ЭДТА на

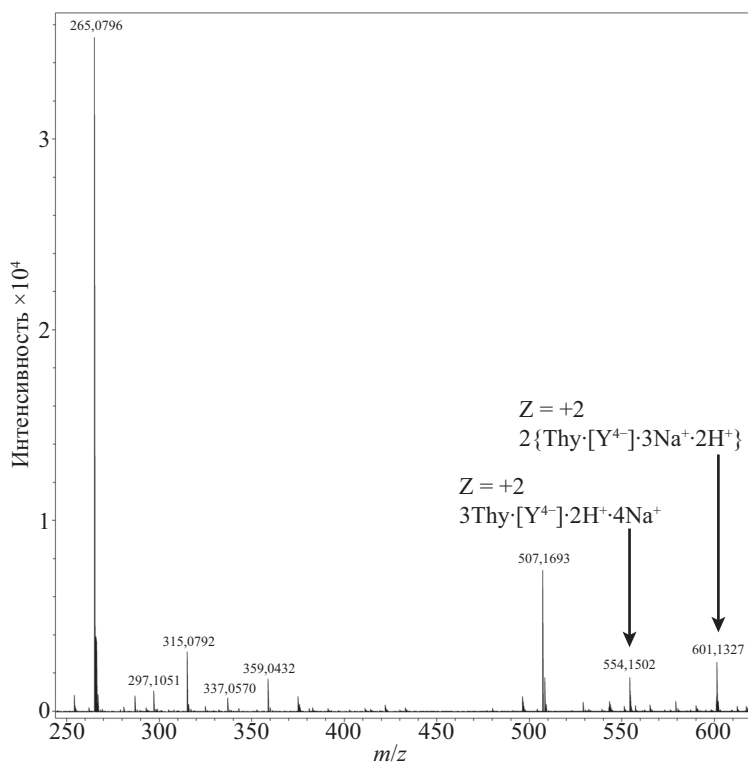


Рис. 4. Масс-спектр раствора тимидина в присутствии ЭДТА:
 $C(\text{Thy}) = C(\text{ЭДТА}) = 10^{-4}\text{М}$

фоточувствительность ДНК в растворе. В результате УФ-С облучения ($\lambda_{\text{обл.}} = 254\text{ нм}$) возникают заметные изменения в спектре УФ-поглощения ДНК: снижение интенсивности в максимуме, рост интенсивности при $\lambda < 250\text{ нм}$ [41]. Эти спектральные изменения являются результатом наложения нескольких эффектов. Во-первых, образование фотодимеров тимина сопровождается снижением поглощения на длине волны 260 нм [42, 43]. Во-вторых, нарушение вторичной структуры ДНК (в основном возникающее в местах скопления тиминовых димеров [44]) приводит к гиперхромному эффекту. Известно, что тиминовые димеры практически не поглощают на длинах волн $\lambda > 260\text{ нм}$: отношение коэффициентов экстинкции тимина и димера тимина при $\lambda = 260\text{ нм}$ $\epsilon_{\text{тим}}/\epsilon_{\text{тим. дим.}} = 60$ [42]. Поэтому, если произвести гидролиз УФ-облучённой ДНК и определить концентрацию хромофоров по методу Спирина [29], то в полученную величину димеры тимина практически не внесут вклада, и мы определим концентрацию азотистых оснований, не подвергшихся фотопревращениям. Результаты вычисления приведены в таблице, где также даны значения молярного коэффициента экстинкции ДНК, характеризующего её степень спиральности.

В системах, содержащих Cu^{2+} , в результате УФ-С облучения наблюдается более заметный рост $\epsilon_{260}(P)$, чем в водном растворе, что свидетельствует о большей дестабилизации вторичной структуры ДНК. Добавление ЭДТА в раствор ДНК с Cu^{2+} несколько смягчает эффект, однако величина $\epsilon_{260}(P)$ после УФ-С облучения в этой системе все же остаётся существенно больше, чем в контрольной. В то же время ни в системе (ДНК— Cu^{2+}), ни в системе (ДНК— Cu^{2+} —ЭДТА) не наблюдается заметных отличий

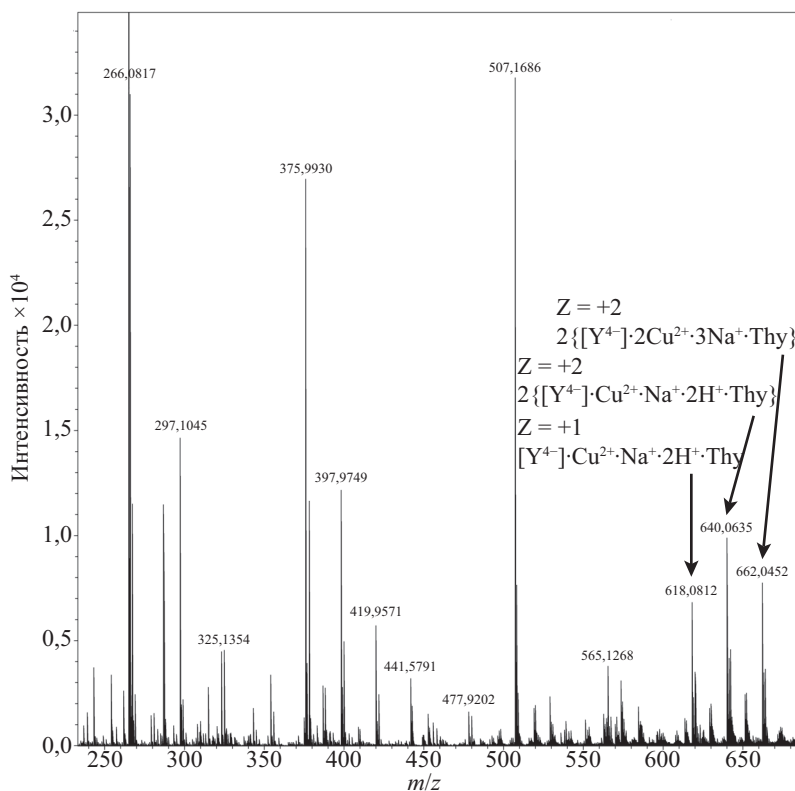


Рис. 5. Масс-спектр раствора тимидина с CuCl_2 , к которому добавлен раствор ЭДТА:
 $C(\text{CuCl}_2) = 10^{-5}\text{M}$, $C(\text{Thy}) = C(\text{ЭДТА}) = 10^{-4}\text{M}$

Концентрация азотистых оснований и молярный коэффициент экстинкции ДНК до и после УФ-С облучения

Компоненты системы	Доза УФ-С облучения, $D_r \pm 100$ кДж/моль	$\epsilon_{260}(P) \pm 100$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$C(\text{а. о.}) \pm 0,0001$, г/дл
ДНК (контроль)	0	6500	0,0017
	880	8000	0,0011
ДНК, CuCl_2	0	6500	0,0017
	880	9800	0,0010
ДНК, CuCl_2 , ЭДТА	0	6400	0,0018
	880	9200	0,0010

от контрольной системы в количестве азотистых оснований, не подвергшихся фото-превращениям. Можно предположить, что дестабилизация вторичной структуры ДНК в растворе, содержащем Cu^{2+} и ЭДТА, происходит вследствие образования комплексов с участием азотистых оснований, ионов меди и ЭДТА, возможно, подобных тем, что мы наблюдали методом масс-спектрометрии.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Методы анализа состава вещества» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

Литература

1. Уильямс Д. Металлы жизни. М.: Мир, 1975. 237 с.
2. Kim H., Wu X., Lee J. SLC31 (CTR) Family of copper transporters in health and disease // *Mol. Aspects Med.* 2013. Vol. 34, N 2–3. P. 561–570.
3. Nanda R., Agrawal V. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl // *Envir. Experim. Botany*. 2016. Vol. 125. P. 31–41.
4. Govindaraju M., Shekar H. S., Sateesha S. B., Vasudeva Raju P., Sambasiva Rao K. R., Rao K. S. J., Rajamma A. J. Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders // *J. Pharmac. Analysis*. 2013. Vol. 3, N 5. P. 354–359.
5. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., 1987. 584 с.
6. Касьяненко Н. А., Дьяконова Н. Е., Фрисман Э. В. Исследование молекулярного механизма взаимодействия ДНК с двухвалентными ионами металлов // *Молек. биология*. 1989. Т. 23. С. 975–982.
7. Shamsi M. H., Kraatz H.-B. Interactions of metal ions with DNA and some applications // *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2013. Vol. 23. P. 4–23.
8. Sigel R. K. O., Sigel H. A stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites // *Accounts Chem. Research*. 2010. Vol. 43, N 7. P. 974–984.
9. Santini C., Pellei M., Gandin V., Porchia M., Tisato F., Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 815–862.
10. Majouga A. G., Zvereva M. I., Rubtsova M. P., Skvortsov D. A., Mironov A. V. et al. Mixed valence copper(I,II) binuclear complexes with unexpected structure: Synthesis, biological properties and anticancer activity // *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 57. P. 6252–6258.
11. Yan D., Aiba I., Chen H. H. W., Kuo M. T. Effects of Cu(II) and cisplatin on the stability of specific protein 1 (Sp1)-DNA binding: Insights into the regulation of copper homeostasis and platinum drug transport // *J. Inorg. Biochem.* 2016. Vol. 161. P. 37–39.
12. Перрин Д. Органические аналитические реагенты. М.: Мир, 1967.
13. Дятлова Н. М., Темкина В. Я., Попов К. И. Комплексоны и комплексонаты металлов. М.: Химия, 1988. 544 с.
14. Пришибил Р. Аналитические применения этилендиаминтетрауксусной кислоты и родственных соединений. М.: Мир, 1975. 531 с.
15. Liu H., Xu L., Gao G.-G., Li F.-Y., Yang Y.-Y., Li Z.-K., Sun Yu. Two-dimensional layer architecture assembled by Keggin polyoxotungstate, Cu(II)–EDTA complex and sodium linker: Synthesis, crystal structures, and magnetic properties // *J. Solid State Chem.* 2007. Vol. 180. P. 1664–1671.
16. Brody J. R., Kern S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Analyt. Biochem.* 2004. Vol. 333. P. 1–13.
17. Семёнов М. А., Большух Т. В., Красницкая А. А., Малеев В. Я. Исследование гидратации и структурного состояния ДНК человека при длительном хранении // *Проблемы криобиологии*. 1994. № 4. С. 17–22.
18. Joyner J. C., Reichfield J., Cowan J. A. Factors influencing the DNA nuclease activity of iron, cobalt, nickel, and copper chelates // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133. P. 15613–15626.
19. Desbouis D., Troitsky I. P., Belousoff M. J., Spiccia L., Graham B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics // *Coord. Chem. Rev.* 2012. Vol. 256. P. 897–937.
20. Chen M., Li H., Li Q., Xu Zh. Luminescence properties of [Ru(bpy)₂MDHIP]²⁺ modulated by the introduction of DNA, copper(II) ion and EDTA // *Spectrochimica Acta (A)*. 2010. Vol. 75. P. 1566–1570.
21. Ji S., Chen M., Li H., Gan G., Li W. Photoluminescence quenching/recovery kinetics of [Ru(bpy)₂(tatp)]²⁺ and [Ru(bpy)₂(dmtatp)]²⁺ intercalated within DNA by copper(II) ions and EDTA // *Spectrochimica Acta (A)*. 2012. Vol. 88. P. 124–129.
22. Gan G.-L., Chao H., Ji S.-B., Chen L.-L., Li H. Preparation of a DNA-bound [Ru(bpy)₂(mbpibH₂)]²⁺ film and its two-mode luminescence tuning by copper(II) ions and EDTA // *Spectrochimica Acta (A)*. 2012. Vol. 97. P. 297–305.
23. Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletaev A. I. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism // *Biopolymers*. 1973. Vol. 12. P. 89–110.
24. Polyanchko A. M., Andrushchenko V. V., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32. P. 989–996.
25. Касьяненко Н. А., Афанасьева Д. А. Конформационные изменения молекулы ДНК при её взаимодействии с биологически активными соединениями. II. Комплексы ДНК с координационными соединениями кобальта и рутения // *Журн. структ. химии*. 2006. Т. 47, № 1. С. 170–177.

26. Богданов А. А., Космотынская Ю. В., Яковлев К. И., Касьяненко Н. А. Специфика взаимодействия с молекулой ДНК различных изомеров и модификаций двуядерных координационных соединений платины(II) // Журн. структ. химии. 2006. Т. 47, № 1. С. 178–184.
27. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M. D. Sequence-dependent basepair opening in DNA double helix // Biophys. J. 2006. Vol. 90. P. 3091–3099.
28. Eigner J., Doty P. Native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 12. P. 549–580.
29. Спириин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656–662.
30. ГОСТ 10398-76. Реактивы и особо чистые вещества. Комплексонометрический метод определения содержания основного вещества, 1977.
31. Ushkov P. A., Nikolaev A. I., Paston S. V. DNA complexes with divalent cations in the presence of EDTA // Abstr. 8th Inter. Symposium "Molecular Order and Mobility in Polymer Systems". St. Petersburg, 2014. P. 180.
32. Пастон С. В., Ушков П. А. Изучение кинетики взаимодействия ДНК с ионами меди // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 4. Физика. Химия. 2014. Т. 1 (59), вып. 4. С. 508–512.
33. Касьяненко Н. А., Бартошевич С. Ф., Фрисман Э. В. Исследование влияния pH среды на конформацию молекулы ДНК // Молек. биология. 1985. Т. 19. С. 1386–1393.
34. Kasyanenko N. A., Prokhorova S. A., Haya Enriquez E. F., Sudakova S. S., Frisman E. V. et. al. Interaction of protonated DNA with transdichlorodiammineplatinum(II) // Colloids and Surfaces (A). 1999. Vol. 148. P. 121–128.
35. El-Sherif A. A., Shoukry M. M., Hosny W. M., Abd-Elmoghny M. G. Complex formation equilibria of unusual seven-coordinate Fe(EDTA) complexes with DNA constituents and related bio-relevant ligands // J. Solution Chem. 2012. Vol. 41. P. 813–827.
36. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. 493 с.
37. Banoub J. H., Limbach P. A. Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2009. 504 p.
38. Rosu F., Gabelica V., Houssier C., De Pauw E. Determination of affinity stoichiometry and sequence-selectivity of minor groove binder complexes with double-stranded oligodeoxynucleotides by electrospray ionization mass spectrometry // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, N 16. P. e82-1–e82-9.
39. Oehlers L., Mazzitelli C. L., Brodbelt J. S., Rodriguez M., Kerwin S. Evaluation of complexes of DNA duplexes and novel benzoxazoles or benzimidazoles by electrospray ionization mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004. Vol. 15. P. 1593–1603.
40. Смут К., Хенуолт Ф. Молекулярная фотобиология. М.: Мир, 1972. 271 с.
41. Parr M., Paston S., Platonov D. Modification of UVC-induced DNA destruction *in vitro* // FEBS Journal. 2013. Vol. 280. (Suppl. 1). P. 70.
42. Конев С. В., Вологовский И. Д. Фотобиология. Минск: Изд-во БГУ им. Ленина, 1979. 383 с.
43. Kielbassa C., Roza L., Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light // Carcinogenesis. 1997. Vol. 18. P. 811–816.
44. Шафрановская Н. Н., Трифонов Э. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Дальняя миграция энергии электронного возбуждения по молекуле ДНК // Письма в Журн. эксп. теор. физики. 1972. Т. 15. С. 404–408.

References

1. Williams D. R. *The metals of life*. Van Nostrand-Reinhold, 1971. 172 p. [Russ. ed.: Уил'ямс Д. *Металлы жизни*. Moscow, Mir Publ., 1975. 237 p.]
2. Kim H., Wu X., Lee J. SLC31 (CTR) Family of copper transporters in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 2013, vol. 34, no 2–3, pp. 561–570.
3. Nanda R., Agrawal V. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. *Envir. Experim. Botany*, 2016, vol. 125, pp. 31–41.
4. Govindaraju M., Shekar H. S., Sateesha S. B., Vasudeva Raju P., Sambasiva Rao K. R., Rao K. S. J., Rajamma A. J. Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. *J. Pharmac. Analysis*, 2013, vol. 3, no 5, pp. 354–359.
5. Zenger V. *Printsipy strukturnoi organizatsii nukleinovyykh kislot* [Principles of the structural organization of nucleic acids]. Moscow, 1987, 584 p. (In Russian)
6. Kasyanenko N. A., D'iakonova N. E., Frisman E. V. Issledovanie molekuliarnogo mekhanizma vzaimodeistviia DNK s dvukhvalentnymi ionami metallov [Research of the molecular mechanism of interaction

of DNA with bivalent ions of metals]. *Molek. biologiya* [Molecular Biology], 1989, vol. 23, pp. 975–982. (In Russian)

7. Shamsi M. H., Kraatz H.-B. Interactions of metal ions with DNA and some applications. *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2013, vol. 23, pp. 4–23.

8. Sigel R. K. O., Sigel H. A stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites. *Accounts Chem. Research*, 2010, vol. 43, no 7, pp. 974–984.

9. Santini C., Pellei M., Gandin V., Porchia M., Tisato F., Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, pp. 815–862.

10. Majouga A. G., Zvereva M. I., Rubtsova M. P., Skvortsov D. A., Mironov A. V. et al. Mixed valence copper(I,II) binuclear complexes with unexpected structure: Synthesis, biological properties and anticancer activity. *J. Med. Chem.*, 2014, vol. 57, pp. 6252–6258.

11. Yan D., Aiba I., Chen H. H. W., Kuo M. T. Effects of Cu(II) and cisplatin on the stability of specific protein 1 (Sp1)-DNA binding: Insights into the regulation of copper homeostasis and platinum drug transport. *J. Inorg. Biochem.*, 2016, vol. 161, pp. 37–39.

12. Perrin D. *Organicheskie analiticheskie reagenty* [Organic analytical reagents]. Moscow, Mir Publ., 1967. (In Russian)

13. Diatlova N. M., Temkina V. Ia., Popov K. I. *Kompleksy i kompleksy metallov* [Complexes and complexones of metals]. Moscow, Khimiya Publ., 1988, 544 p. (In Russian)

14. Prshibil R. *Analiticheskie primeneniia etilendiamintetrausnoi kisloty i rodstvennykh soedinenii* [Analytical applications of an etilendiamintetracetic acid and related connections]. Moscow, Mir Publ., 1975, 531 p. (In Russian)

15. Liu H., Xu L., Gao G.-G., Li F.-Y., Yang Y.-Y., Li Z.-K., Sun Yu. Two-dimensional layer architecture assembled by Keggin polyoxotungstate, Cu(II)—EDTA complex and sodium linker: Synthesis, crystal structures, and magnetic properties. *J. Solid State Chem.*, 2007, vol. 180, pp. 1664–1671.

16. Brody J. R., Kern S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 2004, vol. 333, pp. 1–13.

17. Semenov M. A., Bol'bukh T. V., Krasnitskaia A. A., Maleev V. Ia. Issledovanie gidratatsii i strukturnogo sostoiianiia DNK cheloveka pri dlitel'nom khraneniia [Research of hydration and structural condition of human DNA at long storage]. *Problemy kribiologii* [Cryobiology Problems], 1994, no 4, pp. 17–22. (In Russian)

18. Joyner J. C., Reichfield J., Cowan J. A. Factors influencing the DNA nuclease activity of iron, cobalt, nickel, and copper chelates. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, pp. 15613–15626.

19. Desbouis D., Troitsky I. P., Belousoff M. J., Spiccia L., Graham B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coord. Chem. Rev.*, 2012, vol. 256, pp. 897–937.

20. Chen M., Li H., Li Q., Xu Zh. Luminescence properties of [Ru(bpy)₂MDHIP]²⁺ modulated by the introduction of DNA, copper(II) ion and EDTA. *Spectrochimica Acta (A)*, 2010, vol. 75, pp. 1566–1570.

21. Ji S., Chen M., Li H., Gan G., Li W. Photoluminescence quenching/recovery kinetics of [Ru(bpy)₂(tatp)]²⁺ and [Ru(bpy)₂(dmtatp)]²⁺ intercalated within DNA by copper(II) ions and EDTA. *Spectrochimica Acta (A)*, 2012, vol. 88, pp. 124–129.

22. Gan G.-L., Chao H., Ji S.-B., Chen L.-L., Li H. Preparation of a DNA-bound [Ru(bpy)₂(mbpibH₂)]²⁺ film and its two-mode luminescence tuning by copper(II) ions and EDTA. *Spectrochimica Acta (A)*, 2012, vol. 97, pp. 297–305.

23. Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletaev A. I. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. *Biopolymers*, 1973, vol. 12, pp. 89–110.

24. Polyanichko A. M., Andrushchenko V. V., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. 989–996.

25. Kasyanenko N. A., Afanas'eva D. A. Konformatsionnye izmeneniia molekuly DNK pri ee vzaimodeistvii s biologicheskimi aktivnymi soedineniiami. II. Kompleksy DNK s koordinatsionnymi soedineniiami kobal'ta i ruteniia [Conformational changes of molecule DNA at its interaction with biologically active connections. II. The DNA complexes with coordination compounds of cobalt and ruthenium]. *Zhurn. strukt. khimii* [Journal of Structural Chemistry], 2006, vol. 47, no 1, pp. 170–177. (In Russian)

26. Bogdanov A. A., Kosmotynskaia Iu. V., Iakovlev K. I., Kasyanenko N. A. Spetsifika vzaimodeistviia s molekuloi DNK razlichnykh izomerov i modifikatsii dvuiadernykh koordinatsionnykh soedinenii platiny(II) [Specifics of interaction with molecule DNA of various isomers and modifications of two-nuclear coordination compounds of platinum(II)]. *Zhurn. strukt. khimii* [Journal of Structural Chemistry], 2006, vol. 47, no 1, pp. 178–184. (In Russian)

27. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M. D. Sequence-dependent basepair opening in DNA double helix. *Biophys. J.*, 2006, vol. 90, pp. 3091–3099.

28. Eigner J., Doty P. Native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, 1965, vol. 12, pp. 549–580.
29. Spirin A. S. Spektrofotometricheskoe opredelenie summarnogo kolichestva nukleinovyykh kislot [Spectrophotometric determination of total amount of nucleic acids]. *Biokhimiia* [Biochemistry], 1958, vol. 23, pp. 656–662. (In Russian)
30. GOST 10398-76 *Reaktivy i osobo chistye veshchestva. Kompleksonometricheskii metod opredeleniia sodержaniia osnovnogo veshchestva* [Reactants and especially pure substances. Complexonometric method of determination of content of the main substance], 1977. (In Russian)
31. Ushkov P. A., Nikolaev A. I., Paston S. V. DNA complexes with divalent cations in the presence of EDTA. *Abstr. 8th Inter. Symposium "Molecular Order and Mobility in Polymer Systems"*, St. Petersburg, 2014, pp. 180.
32. Paston S. V., Ushkov P. A. Izucheniye kinetiki vzaimodeistviya DNK s ionami medi [Kinetics of DNA interaction with copper ions]. *Vestnik St. Petersburg University. Series 4. Physics. Chemistry*, 2014, vol. 1 (59), iss. 4, pp. 508–512. (In Russian)
33. Kasyanenko N. A., Bartoshevich S. F., Frisman E. V. Issledovaniye vliyaniya pH sredy na konformatsiiu molekuly DNK [Influence research pH medium on conformation of molecule DNA]. *Molek. biologiya* [Molecular Biology], 1985, vol. 19, pp. 1386–1393. (In Russian)
34. Kasyanenko N. A., Prokhorova S. A., Haya Enriquez E. F., Sudakova S. S., Frisman E. V. et. al. Interaction of protonated DNA with transdichlorodiammineplatinum(II). *Colloids and Surfaces (A)*, 1999, vol. 148, pp. 121–128.
35. El-Sherif A. A., Shoukry M. M., Hosny W. M., Abd-Elmoghny M. G. Complex formation equilibria of unusual seven-coordinate Fe(EDTA) complexes with DNA constituents and related bio-relevant ligands. *J. Solution Chem.*, 2012, vol. 41, pp. 813–827.
36. Lebedev A. T. *Mass-spektrometriya v organicheskoy khimii* [Mass spectrometry in organic chemistry]. Moscow, Binom. Laboratoriya znaniy, 2003. 493 p. (In Russian)
37. Banoub J. H., Limbach P. A. Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2009, 504 p.
38. Rosu F., Gabelica V., Houssier C., De Pauw E. Determination of affinity stoichiometry and sequence-selectivity of minor groove binder complexes with double-stranded oligodeoxynucleotides by electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, no 16, pp. e82-1–e82-9.
39. Oehlers L., Mazzitelli C. L., Brodbelt J. S., Rodriguez M., Kerwin S. Evaluation of complexes of DNA duplexes and novel benzoxazoles or benzimidazoles by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, vol. 15, pp. 1593–1603.
40. Smith K. C., Hanewalt Ph. C. *Molecular photobiology: Inactivation and recovery*. Academic Press, 1969. 246 p. [Russ. ed.: Smit K., Kheneuolt F. *Molekuliarnaia fotobiologiya*. Moscow, Mir Publ., 1972. 271 p.]
41. Parr M., Paston S., Platonov D. Modification of UVC-induced DNA destruction *in vitro*. *FEBS J.*, 2013, vol. 280 (suppl. 1), pp. 70.
42. Konev S. V., Volotovskii I. D. *Fotobiologiya* [Photobiology]. Minsk, Lenin BGU Publ., 1979. 383 p. (In Russian)
43. Kielbassa C., Roza L., Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, pp. 811–816.
44. Shafranovskaia N. N., Trifonov E. N., Lazurkin Iu. S., Frank-Kamenetskii M. D. Dal'niaia migratsiya energii elektronnoygo vzbuzhdeniya po molekule DNK [Distant migration of energy of electronic excitement on molecule DNA]. *Pisma v Zhurn. eksp. teor. fiziki*, 1972, vol. 15, pp. 404–408. (In Russian)

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

Контактная информация

Пастон Софья Владимировна — кандидат физико-математических наук, доцент;
e-mail: svpaston@list.ru

Николаев Антон Игоревич — аспирант.

Paston Sofia V. — PhD, Associate Professor; e-mail: svpaston@list.ru

Nikolaev Anton I. — post graduate student.